

# EFISIENSI EKSTRAKSI METABOLIT STEROID ASAL FESES DENGAN PROSES PENGERINGBEKUAN DAN TANPA PROSES PENGERINGBEKUAN UNTUK PERSIAPAN ANALISIS HORMON

## EXTRACTION EFFICIENCY OF FECAL METABOLITE STEROID USING LYOPHILIZATION AND NON-LYOPHILIZATION PROCESS AS A PREPARATION FOR HORMON ANALYSIS

Hera Maheshwari<sup>1</sup>, Pudji Astuti<sup>2</sup>, Luthfiralda Sjahfirdi<sup>3</sup>, Reviany Widjajakusuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680. Telpon: 0251 629459, Fax: 0251 629459, E-mail: [hera\\_maheshwari@yahoo.com](mailto:hera_maheshwari@yahoo.com)

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gajah Mada

<sup>3</sup>Departmen Biologi, FMIPA, Universitas Indonesia

### ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan efisiensi ekstraksi steroid asal feses yang didahului dengan proses pengeringbekuan dan tanpa proses pengeringbekuan (feses basah). Sebanyak 10 contoh feses babirusa (*Babyrusa babyrussa*) betina dari Taman Margasatwa Surabaya yang dikoleksi setiap hari. Ekstraksi feses dalam metanol dilakukan dengan 2 metoda, yaitu ekstraksi feses yang didahului proses pengeringbekuan terlebih dahulu dan ekstraksi feses basah. Efisiensi ekstraksi dari masing-masing contoh ditentukan dengan menghitung perolehan kembali (*recovery*) [<sup>3</sup>H]-estron terkonjugasi ([<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C). Dari hasil perhitungan perolehan kembali [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C, diperoleh rerata efisiensi ekstraksi  $79.60 \pm 4.82$  % untuk ekstraksi yang didahului proses pengeringbekuan dan  $79.03 \pm 6.47$  % untuk ekstraksi feses basah. Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses penyiapan contoh feses sebelum digunakan untuk analisis hormon dapat dilakukan baik dengan proses pengeringbekuan terlebih dahulu maupun ekstraksi langsung terhadap feses basah. Namun, berdasarkan pertimbangan kepraktisan, maka proses ekstraksi feses basah adalah yang lebih baik karena memerlukan waktu yang lebih cepat, biaya yang lebih murah dan ketrampilan yang tidak begitu tinggi dibandingkan dengan proses ekstraksi feses yang dikeringbekuan terlebih dahulu.

**Kata-kata kunci:** efisiensi ekstraksi, metabolit steroid di feses, ekstraksi dengan dan tanpa proses pengeringbekuan

### ABSTRACT

The objective of this research is to compare the extraction efficiency of lyophilized and non-lyophilized fecal samples (wet samples). A total of 10 fecal samples used were collected daily from female babirusa (*Babyrusa babyrussa*) maintained at the Surabaya Zoo. Procedure of methanol extraction was carried out for both lyophilized and wet samples. Individual extraction efficiencies were monitored by the recovery of [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C. The overall mean  $\pm$  SD recoveries obtained from the experiment were  $79.60 \pm 4.82$  % for extraction of lyophilized samples and  $79.03 \pm 6.47$  % for extraction of wet samples. This result showed that fecal samples extraction which is needed for hormone assays can be accomplished using lyophilizing procedure prior to extraction as well as using wet samples, however, considering its practicability, the extraction of wet samples would be better because the speed, the cost, and the skill required in the performance of this method were lower than those of the lyophilized samples extraction.

**Key words:** efficiency of extraction, fecal steroid, lyophilized and wet fecal sampel extraction

## PENDAHULUAN

Pemahaman mengenai biologi/fisiologi reproduksi suatu spesies sangat diperlukan bagi keberhasilan program pengembangbiakan spesies tersebut. Monitoring status reproduksi oleh karenanya merupakan suatu hal yang sangat penting dilakukan untuk mengetahui siklusitas ovarium maupun fungsi testis, selain untuk menentukan tindakan-tindakan yang dianggap perlu dalam menanggulangi gangguan-gangguan reproduksi. Penentuan metoda untuk memonitor status reproduksi seperti ultrasonografi, laparotomi, laparoskopi dan pengukuran kadar hormon reproduksi dilakukan atas pertimbangan informasi yang dikehendaki, jenis satwa dan kondisi saat penentuan status (Heistermann *et al.* 1995).

Mengingat aspek-aspek reproduksi sangat bergantung pada perubahan karakteristik dari produksi hormon, maka analisis status hormonal merupakan suatu metoda tidak langsung yang sangat efektif dalam penentuan status reproduksi (Heistermann *et al.* 1995). Bagi satwa-satwa liar yang eksotik, pengukuran kadar hormon dalam darah sangat sulit dilakukan oleh karena satwa tersebut sulit dikendalikan dan mudah tercekam, sehingga pendekatan non-invasif merupakan cara yang paling memungkinkan diterapkan pada satwa-satwa tersebut (Schwarzenberger *et al.*, 1996). Melalui pendekatan non-invasif, ekskreta satwa baik urin maupun feses dapat digunakan untuk pengukuran kadar hormon reproduksi. Keuntungan utama dari penggunaan metoda ini adalah contoh-contoh ekskreta tersebut dapat dikoleksi dengan mudah tanpa adanya kontak fisik dengan satwa yang bersangkutan (Heistermann *et al.* 1995).

Berkaitan dengan monitoring status hormonal menggunakan pendekatan non-invasif, metoda asainya juga perlu dipertimbangkan untuk mendapatkan hasil yang akurat. Seiring dengan berkembangnya metoda analisis yang semakin mudah dilakukan dengan tingkat sensitifitas yang tinggi, maka diperlukan pula proses penyiapan contoh yang tepat sehingga profil hormon asal ekskreta yang diperoleh dapat menggambarkan profil hormon

yang sesuai dengan siklus reproduksi. Adapun evaluasi dari proses ekstraksi dapat dilakukan dengan menentukan efisiensi ekstraksi yang diperoleh dengan menghitung perolehan kembali (*recovery*) sejumlah tertentu hormon berlabel isotop yang ditambahkan sebelum proses ekstraksi (Heistermann *et al.* 1996).

Berdasarkan atas pemikiran tersebut di atas, maka catatan penelitian ini perlu didiseminasikan dengan tujuan untuk memberikan informasi mengenai efisiensi ekstraksi yang diperoleh dari dua macam metoda ekstraksi, yaitu metoda ekstraksi feses yang didahului proses pengeringbekuan dan metoda ekstraksi secara langsung dari feses basah. Data-data yang diperoleh diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan dalam penentuan metoda ekstraksi yang akan dilakukan terhadap contoh feses sebelum dilakukan analisis hormon, karena proses ekstraksi ini nantinya akan berkaitan dengan akurasi hasil pengukuran hormon yang dikehendaki.

## MATERI DAN METODE

### *Koleksi Contoh*

Contoh feses yang digunakan adalah feses Babirusa (*Babyrusa babyrussa*) betina sebanyak 10 contoh, yang diperoleh dari Taman Margasatwa Surabaya. Contoh tersebut merupakan contoh feses yang dipilih secara acak dari keseluruhan contoh-contoh yang dikumpulkan setiap hari. Segera setelah dikoleksi, contoh-contoh tersebut disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  tanpa penambahan bahan pengawet hingga saat dianalisis.

### *Ekstraksi Contoh*

#### **A. Ekstraksi menggunakan contoh keringbeku**

Prosedur ekstraksi dilakukan menurut metoda yang dikembangkan oleh Heistermann *et al.* (1996). Contoh-contoh yang akan diekstraksi, dikeringbekukan terlebih dahulu menggunakan mesin pengering beku (Freezone Stoppering Tray Dryer, Freeze Dry System, Model 79480, Lab Conco) selama 36 jam, kemudian dihaluskan. Sebanyak 0.05-0.10 g

bubuk feses diekstraksi dengan menggunakan 3 ml metanol 80% dalam H<sub>2</sub>O. Sebelum diekstraksi, [<sup>3</sup>H]-estron terkonjugasi ([<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C), 20.000 cpm; NEN Du Pont, Bad Homburg, Germany) ditambahkan ke dalam 5 contoh secara acak dari 20 contoh yang diekstraksi untuk setiap satu kali proses ekstraksi, kemudian ditutup rapat dan didiamkan selama 5 menit. Setelah divorteks selama 15 menit dan disentrifus pada 2200 x g selama 10 menit, supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung gelas. Monitoring efisiensi ekstraksi dilakukan untuk 2 kali proses ekstraksi, sehingga jumlah contoh yang diberi isotop seluruhnya adalah 10 contoh. Pencacahan isotop dilakukan dengan Liquid Scintillation Spectrometer (Packard Tri-Carb) setelah sebelumnya ditambahkan *Scintillation Cocktail*. Efisiensi ekstraksi diperoleh dengan menghitung perolehan kembali [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C.

#### B. Ekstraksi secara langsung

Metoda ekstraksi secara langsung ini dilakukan sesuai dengan modifikasi metoda yang dikemukakan oleh Schwarzenberger *et al.* (1996). Sisa contoh feses basah yang sebagian telah dikeringbekuan untuk ekstraksi pada metoda A, dihomogenkan terlebih dahulu kemudian ditimbang sebanyak 0.5 g dan dimasukkan ke dalam tabung polipropilen, kemudian ditambahkan 0.5 ml aquabidest dan 4 ml methanol 100%. Sama dengan metoda ekstraksi pada bagian A, hormon berlabel isotop [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C, 20.000 cpm; NEN Du Pont, Bad Homburg, Germany) ditambahkan ke dalam 5 contoh secara acak dari 20 contoh yang diekstraksi untuk setiap satu kali proses ekstraksi, kemudian ditutup rapat dan didiamkan selama 5 menit. Setelah divorteks selama 30 menit dan disentrifus pada 2200 x g selama 15 menit, supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung gelas. Monitoring efisiensi ekstraksi dilakukan untuk 2 kali proses ekstraksi, sehingga jumlah contoh yang diberi isotop seluruhnya adalah 10 contoh. Pencacahan isotop dilakukan dengan Liquid Scintillation Spectrometer (Packard Tri-Carb) setelah sebelumnya ditambahkan *Scintillation*

*Cocktail*. Efisiensi ekstraksi diperoleh dengan menghitung perolehan kembali [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C.

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik untuk mendapatkan nilai rerata  $\pm$  SD dimana nilai rerata dan nilai individual  $\geq$  70% menunjukkan bahwa prosedur yang digunakan memenuhi persyaratan untuk akurasi yang nantinya akan menghasilkan nilai yang akurat pula saat dilakukan analisis hormon yang terkandung dalam ekskreta tersebut.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Efisiensi ekstraksi yang diperoleh dari metoda A secara keseluruhan adalah  $79.60 \pm 4.82$  % sedangkan dari metoda B adalah  $79.03 \pm 6.47$ %.

Nilai ini masih termasuk dalam kisaran nilai yang diperoleh peneliti lain yaitu 61.0-80.8% untuk ekstraksi contoh keringbeku menggunakan [<sup>3</sup>H]-E<sub>1</sub>C (Strier and Ziegler 1994, 1997) dan 66.3-87.8% menggunakan [<sup>3</sup>H]-progesteron (Shideler *et al.* 1994; Strier and Ziegler 1994, 1997; Stavisky *et al.* 1995; Heistermann *et al.* 1996, 2001). Selain menggunakan kedua hormon berlabel tersebut di atas, evaluasi prosedur ekstraksi dapat dilakukan dengan penambahan hormon lain yang berlabel isotop seperti <sup>14</sup>C-E<sub>2</sub>, <sup>14</sup>C-P, <sup>3</sup>H-PdG (Shideler *et al.* 1994), <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> (Strier and Ziegler 1994), <sup>125</sup>I-E<sub>2</sub> dan <sup>125</sup>I-P<sub>4</sub> (Brockman *et al.* 1995), walaupun yang paling umum digunakan adalah <sup>3</sup>H-progesteron sebagai perunut untuk mengevaluasi prosedur ekstraksi secara rutin tanpa memandang jenis hormon yang akan diukur dari ekskreta tersebut (Heistermann *et al.* 1996). Prosedur ekstraksi contoh feses yang telah dikeringbekuan juga dilakukan pada contoh feses Owa Jawa (*Hylobates moloch*) dan efisiensi ekstraksi yang diperoleh adalah  $78.20 \pm 6.60$ % (data tidak dipublikasi).

Pada penentuan prosedur analisis hormon, ada dua faktor penting yang harus diperhatikan yaitu tingkat kepercayaan (*reliability*) dan tingkat kepraktisan (*practicability*). Adapun kriteria dari tingkat kepercayaan adalah akurasi, presisi, spesifisitas dan sensitifitas (Loraine and Bell 1971; Clark

Tabel 1. Nilai perolehan kembali [ $^3\text{H}$ ]-estron terkonjugasi dari metoda ekstraksi contoh yang dikeringbekukan terlebih dahulu (A) dan tanpa keringbeku (B)

No. Contoh	Metoda (A)	Metoda (B)
	Efisiensi ekstraksi (%)	Efisiensi ekstraksi (%)
Ekstraksi I:		
Contoh 1.	78.75	78.75
2.	85.50	74.25
3.	84.38	92.25
4.	74.25	75.38
5.	72.00	74.25
Rerata + SD	78.98 + 5.98	78.98 + 7.65
Ekstraksi II:		
Contoh 1.	78.75	83.25
2.	76.50	76.50
3.	85.50	69.75
4.	83.25	83.79
5.	77.12	82.13
Rerata + SD	80.22 + 3.96	79.08 + 5.97
Rerata keseluruhan + SD	79.60 + 4.82	79.03 + 6.47

and Engval 1980; De'Ath 1988). Salah satu dari kriteria di atas yaitu akurasi, berkaitan erat dengan hasil ekstraksi karena semakin dekat hasil analisis yang diperoleh dengan nilai sebenarnya maka hasil tersebut dikatakan akurat dan hal ini dapat dicapai apabila prosentase ekstrak yang diperoleh memenuhi syarat (nilai efisiensi ekstraksi > 70%) dan tidak terbuang di dalam proses ekstraksi. Tiga kriteria yang lain juga merupakan kriteria yang harus dipenuhi dalam proses analisis (Chard 1990). Faktor lain yaitu tingkat kepraktisan dari prosedur analisis yang harus pula dipenuhi adalah waktu yang diperlukan untuk melaksanakan kegiatan (kecepatan), biaya dan keahlian/ketrampilan (Loraine and Bell 1971). Apabila dilihat dari segi kepraktisan, maka metoda ekstraksi feses basah lebih baik karena prosesnya tidak memerlukan waktu yang lama, biaya relatif rendah dan tidak memerlukan keahlian/ketrampilan yang tinggi dalam mengerjakannya.

Berbagai modifikasi telah dilakukan oleh para peneliti untuk mendapatkan komposisi bahan pengekstrak dengan tujuan mendapatkan efisiensi yang tinggi. Hal ini

menjadi penting karena suatu prosedur ekstraksi dengan efisiensi cukup tinggi tentunya akan menghasilkan nilai pengukuran hormon yang makin akurat (Chard 1990). Selain pemilihan bahan pengekstrak, pemilihan perunut yang akan dipergunakan juga menentukan nilai efisiensi mengingat polaritas dari hormon perunut akan mempengaruhi nilai efisiensi ekstraksi, dimana hormon dengan polaritas yang rendah akan menghasilkan efisiensi yang cenderung lebih rendah (Chard 1990; Heistermann *et al.* 1996). Dalam hal proses penyiapan contoh sebelum diekstraksi juga sebaiknya dipertimbangkan karena kandungan air yang terlalu banyak di dalam contoh akan mempengaruhi konsentrasi hormon yang dianalisis (Graham *et al.* 2001).

Bagi peneliti yang akan melakukan pengukuran metabolit hormon asal urin maupun feses untuk yang pertama kalinya, tentunya proses penyiapan contoh dalam hal ini proses ekstraksi dari ekskreta merupakan tahapan yang kritikal sebelum tahap selanjutnya yaitu analisis hormon yang dilakukan secara rutin. Pertimbangan metoda ekstraksi yang dilakukan dapat didasari atas

ketersediaan dana maupun fasilitas di lapangan/ di laboratorium seperti halnya perangkat untuk melakukan proses pengeringbekuan, selain informasi yang ingin diperoleh dan juga kondisi saat pengumpulan contoh. Bagi satwa-satwa liar, ekskreta yang paling mudah untuk dikoleksi adalah feses, akan tetapi walaupun ekskreta yang akan dipergunakan adalah urin, maka apabila analisis hormon yang dilakukan tidak secara langsung, maka dalam proses hidrolisis maupun ekstraksi urin harus pula dimonitor efisiensi ekstraksinya.

Untuk mendapatkan hasil analisis yang akurat, pengukuran metabolit hormon asal urin maupun feses yang dilakukan secara tidak langsung, dalam hal ini memerlukan proses hidrolisis dan ekstraksi, maka penentuan efisiensi ekstraksi dari prosedur ekstraksi yang dilakukan sangatlah penting.

Metoda ekstraksi metabolit steroid asal feses baik secara langsung (feses basah) maupun dikeringbekuan terlebih dahulu, keduanya dapat dilakukan karena memiliki efisiensi ekstraksi yang cukup tinggi, namun bila dilihat dari segi kepraktisan maka ekstraksi contoh secara langsung akan lebih baik.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penghargaan yang tinggi penulis berikan kepada Prof. K. Hodges dan Dr. M. Heistermann dari German Primate Center yang telah membantu dalam pengadaan perunut hormon berlabel isotop, drh. Muhammad Agil, MSc yang telah membantu dalam proses peruntutan isotop, Dr. A. MacDonald dari the University of Edinburgh dengan kerjasamanya dengan pihak Taman Margasatwa Surabaya untuk pengadaan contoh feses, Bapak Yosep Saepudin dari Lab RIA, BPT Ciawi untuk bantuannya dalam pencacahan isotop serta teknisi Laboratorium Fisiologi FKH-IPB untuk bantuannya dalam proses ekstraksi.

#### DAFTAR PUSTAKA

Brockman, D.K., Whitten, P.L., Russell, E., Richard, A.F. and Izard, M.K., 1995. Application of fecal steroid techniques

to the reproductive endocrinology of female Verreaux's Sifaka (*Propithecus verreauxi*). *Am. J. Primatol.* 36, 313-325.

Chard, T., 1990. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier, Amsterdam.

Clark, B.R. and Engvall, E., 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and Practical Aspects. In: *Enzyme-Immunoassay*, Maggio, E.T., (ed). CRC Pr. pp. 167-180.

De' Ath, G., 1988. Sensitivitas dan spesifisitas: Beberapa Pertimbangan Epidemiologi. In: *Teknologi Elisa Dalam Diagnosis dan Penelitian.*, Artama, W.T., (penerjemah). Gadjah Mada University, Indonesia Press. pp. 177-186.

Graham, L., Schwarzenberger, F., Mostl, E., Galama, W. and Savage A., 2001. A Versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biol.* 20:227-236.

Heistermann, M., Möstl, E., Hodges, J.K., 1995. Non-invasive endocrine monitoring of female reproductive status: Methods and applications to captive breeding and conservation of exotic species. In: *Research And Captive Propagation*, Gansloßer, U., Hodges, J.K., Kammans, W (eds). Erlangen, Filander verlag GmbH. pp. 36-48.

Heistermann, M., Möhle, U., Vervaecke, H., Van Elsacker, L., Hodges, J.K., 1996. Application of urinary and fecal steroid measurements for monitoring ovarian function and pregnancy in the Bonobo (*Pan paniscus*) and evaluation of perineal swelling patterns in relation to

- endocrine events. *Biol. Reprod.* 55:844-853.
- Heistermann, M., Uhrigshardt, J., Husung, A., Kaumanns, W., Hodges, J.K., 2001. Measurement of faecal steroid metabolites in the lion-tailed macaque (*Macaca silenus*): A non-invasive tool for assessing female ovarian function. *Primate Rep.* 59:27-42.
- Loraine, J.A., Bell, E.T. 1971. *Hormone assay and their clinical application*. 3<sup>rd</sup> ed. E&S Livingstone, Edinburgh.
- Schwarzenberger, F., Mostl, E., Palme, R., Bamberg, E., 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 515-526.
- Shideler, S.E, Savage, A., Ortuno, A.M., Moorman, E.A., Lasley, B.L., 1994. Monitoring female reproductive function by measurement of fecal estrogen and progesterone metabolites in the white-faced saki (*Pithecia pithecia*). *Am. J. Primatol.* 32:95-108.
- Stavisky, R., Russel, E., Stallings, J., Smith, E., O., Worthman C., Whitten, P.L., 1995. Fecal steroid analysis of ovarian cycles in free-ranging baboons. *Am. J. Primatol.* 36:285-297.
- Strier, K.B. and Ziegler, T.E., 1994. Insights into ovarian function in wild muriqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*). *J. Med. Primatol.* 32:31-40.
- Strier, K.B. and Ziegler, T.E., 1997. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. *Am. J. Primatol.* 42:299-310.